

⑯ 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-83284

⑩ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 N 5/00  
C 12 M 3/00  
// A 01 N 1/00  
(C 12 N 5/00  
C 12 R 1/91 )

識別記号

厅内整理番号  
7235-4B  
6971-4B  
6742-4H

⑪ 公開 昭和57年(1982)5月25日

発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

④ 培養細胞の密封凍結方法および凍結容器

⑦ 発明者 井沢正雄

八王子市中野町2450

⑧ 特願 昭55-158095

⑨ 出願 昭55(1980)11月12日

オリンパス光学工業株式会社  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番  
2号

⑩ 発明者 立川幸子

⑪ 代理人 弁理士 杉村暁秀 外1名

八王子市並木町24-16吟風荘

明細書

1. 発明の名称 培養細胞の密封凍結方法および凍結容器

2. 特許請求の範囲

1. 可撓性で熱軟化性の材料より成る凍結容器に培養細胞の分散した細胞浮遊液を注入する工程と、この細胞浮遊液を収容した前記凍結容器を遠心分離して培養浮遊液より培養細胞を分離する工程と、分離した細胞浮遊液の上澄液を排出する工程と、この分離した培養細胞に栄養培地を注入・搅拌する工程と、前記凍結容器の開口部分を密封する密封工程と、この密封した凍結容器を冷凍する凍結工程とを具えることを特徴とする培養細胞の密封凍結方法。

2. 前記凍結容器の開口部分を密封する際に可撓性で熱軟化性材料より成るラベルを凍結容器に沿滑することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の培養細胞の密封凍結方法。

3. 可撓性で熱軟化性材料より成り、培養細

と栄養培地を収容し凍結保存するアンブル部と、このアンブル部を遠心分離機に回動自在に支持する取つ手部と、この取つ手部により容器を支持した状態で培養細胞、栄養培地の注入、排出を行ラシリソジを前記アンブル部に導くための案内部と、これらアンブル部と案内部を連結し、このアンブル部の開口部分を密封・切断して凍結用アンブルにする密封部とを具えることを特徴とする培養細胞用凍結容器。

3. 発明の詳細を説明

本発明は培養細胞の凍結保存方法およびこれに用いる凍結容器に関するものである。

従来の培養細胞の凍結方法では培養瓶で増殖培養した細胞を各種工程に適した容器即ちガラス製造血管、凍結アンブルを用いて凍結保存していた。

第1図は従来の培養細胞の凍結方法の操作を示すフローティートである。

培養工程1で培養瓶に培養液を入れ細胞を培養する、培養細胞は培養瓶の内壁に付着して増殖す

る。次に分散工程2で培養液を排出し、浮遊液を注入し、壁に付いた培養細胞を均一に分散した細胞浮遊液を作る。次に移動注入工程でこの細胞浮遊液をガラス製の遠心管に移し、遠心機装着工程4でこの遠心管を遠心機に取り付ける。次に遠心工程5で1000 rpmで5分間遠心分離して細胞浮遊液を浮遊液の上澄と細胞沈渣に分離する。次に排出工程6でこの遠心管を遠心分離機より取り出して手で遠心管を傾けて上澄を排出する。次に凍結液工程7でグリセリン等の保護物質を含む栄養培地をシリジンで注入し、同時に吸引、排出を繰り返して培養細胞を再度栄養培地中に分散させて凍結用の細胞浮遊液を得る。次に移動注入工程8でシリジンにこの細胞浮遊液を吸引しガラス製の凍結アンプルに移す。次に密封工程9で、凍結アンプルの細胞浮遊液の部分は氷冷しながらガスバーナーの炎で凍結アンプル先端部を密封する。このようにしてできた凍結アンプルにはラベル貼布工程10で、この培養細胞の細胞名、世代数、凍結年月日等を書いたラベルを貼布し、

冷凍工程11で冷凍する。この際急激な冷却で培養細胞がこわれないよう冷却速度を調節して最後には液体窒素槽につけ凍結保存する。しかし上記のような凍結方法では、培養細胞の細菌汚染を防ぐため凍結前のアンプル密封操作は速やかに行わなければならぬのに、培養細胞は培養瓶から遠心管、凍結アンプルと移し換えねばならず、又密封作業もガスバーナ炎の高溫下において手作業で行うため作業が煩雑で時間もかかり培養細胞が熱障害を起こすと同時に細菌汚染の危険性が大きい欠点があつた。またガラス製遠心管はその側壁に細胞がこびりつき細胞の回収率が悪い上に遠心分離機内で底が割れることもあり、ガラス製凍結アンプルは全体が、また特に密封時には先端部が割れるので取扱いが難かしく自動化の妨げになる等の多くの欠点があつた。更に従来の凍結アンプルに貼布するラベルは特に液体窒素槽内で取れやすいという欠点を有していた。

本発明の目的は上述した欠点を除去し、培養細胞の凍結保存法に關し一連の工程をより簡易化し、

細菌汚染の危険なく、高い回収率で培養細胞を凍結し、特に自動化に適するよう適切に構成した培養細胞の密封凍結方法およびその凍結容器を提供することにある。

本発明は可撓性で熱軟化性の材料より成る凍結容器に培養細胞の分散した細胞浮遊液を注入する工程と、この細胞浮遊液を収容した前記凍結容器を遠心分離して培養浮遊液より培養細胞を分離する工程と、分離した細胞浮遊液の上澄液を排出する工程と、この分離した培養細胞に栄養培地を注入・攪拌する工程と、前記凍結容器の開口部分を密封する密封工程と、この密封した凍結容器を冷凍する凍結工程とを具えることを特徴とするものである。

本発明は可撓性で熱軟化性材料より成り、培養細胞と栄養培地を収容し凍結保存するアンプル部と、このアンプル部を遠心分離機に回動自在に支持する取つ手部と、この取つ手部により容器を支持した状態で培養細胞、栄養培地の注入、排出を行うシリジンを前記アンプル部に導くための案内

部と、これらアンプル部と案内部を連結し、このアンプル部の開口部分を密封・切断して凍結用アンプルにする密封部とを具えることを特徴とするものである。

以下図面を参照して本発明を詳細に説明する。  
第2図は本発明の培養細胞の密封凍結方法の順次の工程の一例を示すフローナレートである。培養細胞を増殖し、その培養細胞の分散した細胞浮遊液を作る工程1,2は第1図で示した従来のものと同じである。次に移動注入工程13でこの細胞浮遊液をシリジンで吸引し本発明の可撓性で熱軟化性材料より成る凍結容器に吐出する。次に遠心機装着工程14でこの凍結容器を遠心分離機のロータのキヤリアに直接取り付ける。次に遠心工程15で遠心分離して細胞浮遊液を浮遊液の上澄と細胞沈渣に分離する。次に遠心分離機のロータの回転を止め凍結容器をキヤリア上に乗せたままシリジンにより上澄を排出する。次に凍結液工程16で別のシリジンでグリセリン等の保護物質を含む栄養培地を細胞沈渣に注入し、同時に吸引排

出を繰り返して培養細胞を再び栄養培地中に分散させた凍結用の細胞浮遊液を得る。次に密封・ラベリング工程 1/7 でこの凍結容器を速心分離機のロータのキャリアに乗せたまま電気的ヒーターにより加熱した接着カツタで凍結容器を密封し切断して凍結アンブルを得る。この際凍結容器に可撓性で熱軟化性材料より成るラベルを電気的ヒーターで接着する。次にこのようにしてできた凍結アンブルを冷凍工程 1/8 で冷凍する。

第 3 図は本発明の培養細胞の密封凍結方法に用いる凍結容器の一例の構成を示す縦断面図である。

可撓性で熱軟化性材料本例ではテフロン(商品名)より成る凍結容器 30 は、培養細胞と栄養培地を収容し凍結保存するアンブル部 31 と、このアンブル部 31 を速心分離機に回動自在に支持する取つ手部 32 と、この取つ手部で容器 30 を保持した状態で培養細胞、栄養培地の注入、排出を行うシリジンを前記アンブル部 31 に導くための案内部 33 と、これらアンブル部 31 と案内部 33 を連結し、このアンブル部 31 の開口部分を密封・

切断して凍結用アンブルにする接着部 34 を具える。このような構成の本発明凍結容器の動作を第 4 図に示す。

第 4 図(a)および(b)は回転中の本発明凍結容器と速心分離機のキャリアの一例の構成を示す縦断面図および側面図である。凍結容器 31 の取つ手部 32 は速心分離機のロータのキャリア 35 に第 4 図(b)のように引っ掛かるのでアンブル部 31 に細胞浮遊液を入れてキャリア 35 を回転すれば第 4 図(b)の矢印 A 方向に遠心力がかかり細胞浮遊液 36 より細胞沈渣 37 を分離できる。

第 5 図は速心分離後の本発明凍結容器の動作を説明するための概図である。遠心分離を行なつた後、速心分離機のキャリア 35 の回転を止め、凍結容器 30 をその取つ手部 32 を中心にして回動し垂直にたれ下げる。次にシリジン 38 を凍結容器 30 内に挿入し図示しない尿液装置のポンプ装置で細胞浮遊液の上澄を吸引し廃棄する。この時細胞沈渣 37 を舞い上がりさせない様にシリジン 38 のさし込み深度を調節しシリジン 38 の先端が細胞

沈渣 37 と一定距離を保つようにし、培養細胞の利用率を高める。次に上澄を取り除いた後、第 4 図(b)に示すように凍結容器 31 を垂直に保持し、シリジン 38 を凍結容器 30 内に挿入し、図示しないポンプ装置でクリセリンに細胞保護物質を含有した栄養培地(BMES+)を 1 ml 程度、アンブル部の約半量を目安にして注入し、適当に吸引、排出を行ない細胞沈渣 37 が栄養培地に均一に分散した凍結用の細胞浮遊液を作る。

第 6 図は本発明凍結容器の密封方法を説明するための一例の構成を示す概図である。凍結容器 30 の接着部 34 に電気的内蔵ヒーターにより 300°C 程度に熱した一対のステンレス製の接着カツタ 40 を両側より挟むよう第 6 図(a)の矢印 B 方向に押しつけ接着し、そして切断する。第 6 図(b)は接着部切断した状態を示す。凍結容器 30 の案内部 33 と接着部 34 の一部は一緒に廃棄し、アンブル部 31 と接着部 34 の一部は凍結アンブルとして凍結保存する。尚接着カツタ 40 の互いに対向する面には切断のための鋭利な矢起を設けてよい。

第 7 図(a)および(b)は本発明の凍結アンブルに可撓性で熱軟化性の材料、本例ではテフロンより成るラベル 41 を接着した一例の構成を示す正面図および側面図である。上述の凍結アンブルの接着の際接着カツタ 40 で細胞名、世代数、凍結年月日等を印字したテフロン製ラベル 41 と接着部 34 を同時に接着する。テフロン製ラベル 41 はその接着部で凍結アンブルと一緒に接着するので紙ラベル等の接着に比べ確実に固定することができる。

以上の説明から明らかのように本発明の培養細胞の密封凍結方法およびその凍結容器によれば、培養瓶で培養した培養細胞の移動は一度凍結容器に移すだけであり、従来の遮心管からアンブルに移す工程が省略でき、その分の培養細胞の利用率を高めることができると共に、速心分離工程からアンブル密封に至るまでの工程は速心分離機のキャリア上で行なえるのでこの間の処理時間が短縮でき培養細胞の細菌汚染の危険性を少なくて済む利点がある。従つて高速化、自動化に適用しやすい効果がある。

また本発明の凍結容器は可撓性で熱軟化性の材料例えばテフロン(商品名)より成るので、電気的ヒータを内蔵した金属性カツタによりガスの炎を使用しないでかなり低温で密封できるので培養細胞に熱障害が起りにくく解凍後の細胞の生存率を高められる利点がある。またカラス製容器に比べ割れにくく、高圧蒸気滅菌が可能となり作業の高速化、自動化に適用できる利点がある。更に密封工程の際、可撓性で熱軟化性の材料、例えばテフロンより成るラベルを同時に搭着すれば、液体窒素の浸漬中にまかれないマーカとなる効果がある。

#### 4. 図面の簡単な説明

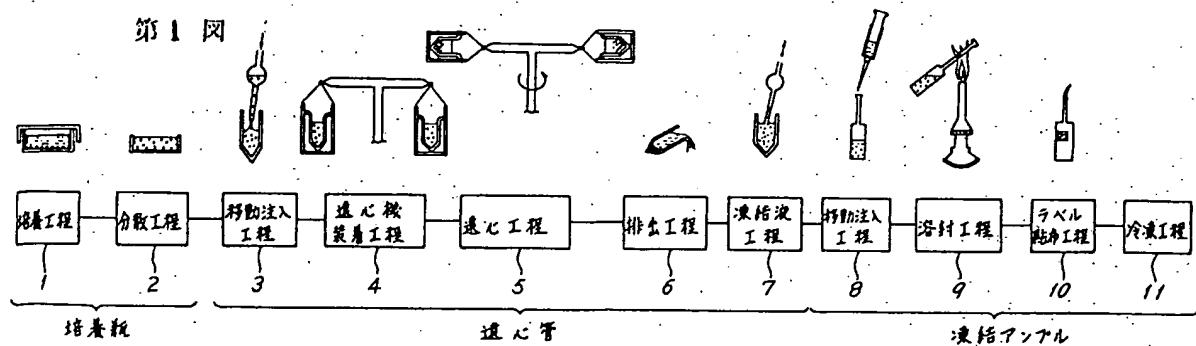
第1図は従来の培養細胞の凍結方法の順次の工程を示すフローチャート、第2図は本発明の培養細胞の密封凍結方法の順次工程の一例を示すフローチャート、第3図は本発明の培養細胞の密封凍結方法に用いる凍結容器の一例の構成を示す縦断面図、第4図(a)および(b)は回転中の本発明凍結容器と遠心分離機のキャリアの一例の構成を示す

特開昭57-83284(4)

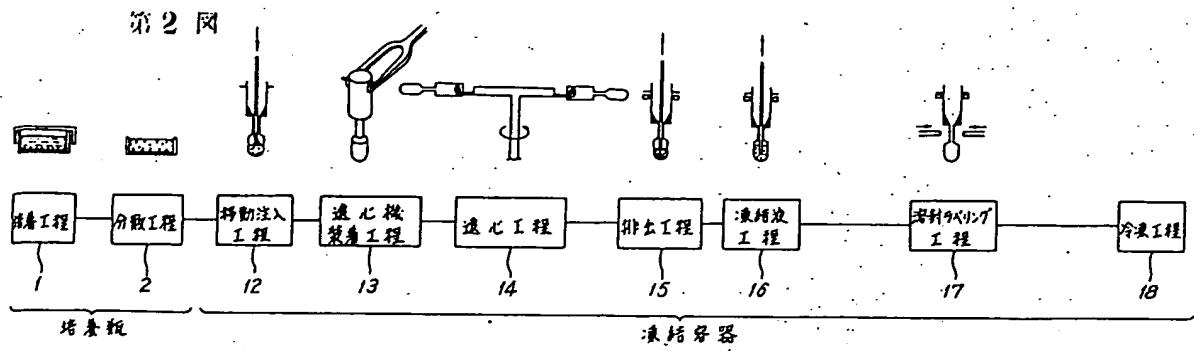
断面図および側面図、第3図は遠心分離後の本発明凍結容器の動作を説明するための縦図、第6図は本発明凍結容器の密封方法を説明するための一例の構成を示す縦図、第7図(a)および(b)は本発明の凍結アンプルにテフロンより成るラベルを搭着した一例の構成を示す正面図および側面図である。

30…凍結容器、31…アンプル部、32…取っ手部、33…案内部、34…密封部、35…キャリア、36…細胞浮遊液、37…細胞沈渣、38、39…シリンジ、40…密封カツタ、41…テフロン製ラベル。

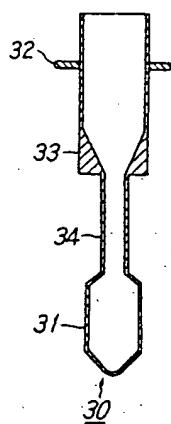
第1図



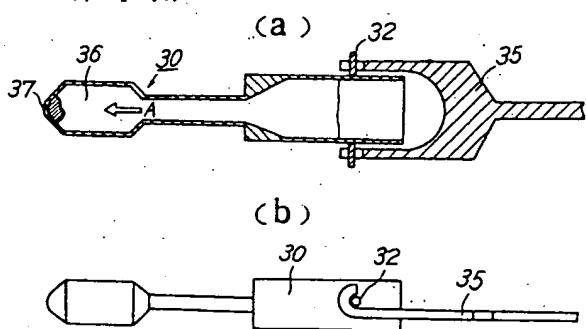
第2図



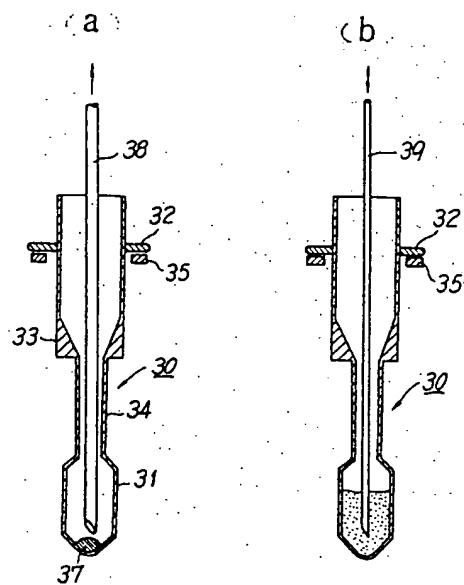
第3図



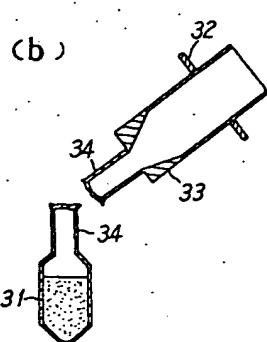
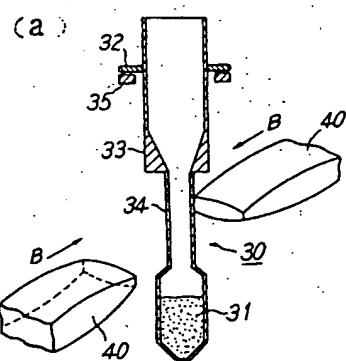
第4図



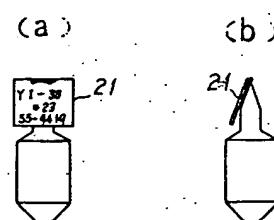
第5図



第6図



第7図



手 続 補 正 書

昭和 56 年 1 月 22 日

特許庁 長官  
審査課 島田 春樹 殿

1. 事件の表示

昭和 55 年 特 許 願 第 158095 号

2. 発明の名称

培養細胞の密封凍結方法  
および凍結容器

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(037) オリンパス光学工業株式会社

4. 代理人 〒100 東京都千代田区霞が関3丁目2番4号  
霞山ビルディング 7階  
電話 (581) 2241番 (代表)

(5925) 井理士 杉村 晓秀 殿  
外 1 名

5.

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄および図面

7. 補正の内容 (別紙の通り)

特開昭57- 83284(6)

1. 明細書第3頁第1~2行を「る。次に分散工程  
でこの培養液を排出し、新しい培養液を注入  
し吸引排出をくり返し、壁に付いた培養細胞を  
均一に分散した細」に訂正する。

2. 同第7頁第16行の「12」を「32」に訂正する。

3. 同第9頁第2行の「利用率」を「回収率」に訂  
正し、

同頁第6行の「(BMES+)」を「(BME(S+))」  
に訂正する。

4. 同第10頁第16行の「利用率」を「回収率」に訂  
正する。

5. 図面中第7図(a), (b)を別紙の通り訂正する。

代理人井理士 杉村 晓秀 殿  
外 1 名

手 続 補 正 書

昭和 56 年 12 月 10 日

特許庁 長官  
審査課 島田 春樹 殿

1. 事件の表示

昭和 55 年 特 許 願 第 158095 号

2. 発明の名称

培養細胞の密封凍結方法および凍結容器

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(037) オリンパス光学工業株式会社

4. 代理人 〒100 東京都千代田区霞が関3丁目2番4号  
霞山ビルディング 7階  
電話 (581) 2241番 (代表)

(5925) 井理士 杉村 晓秀 殿  
外 1 名

5.

6. 補正の対象

明細書中発明の詳細な説明、図面の簡単な説明の欄

7. 補正の内容 (別紙の通り)

1. 明細書第3頁第3行「移動注入工樹で」を「移動注入工樹3で」に訂正する。
2. 同第3頁第10行「グリセリン等の保湿物質を含む」を「保湿物質を含むグリセリン等の」に訂正する。
3. 同第3頁第24行「貼布」を「貼付」に訂正する。
4. 同第7頁第18行「シリンジ」を「ためのノズル」に訂正する。
5. 同第8頁第12行「容器の動作」を「方法の工程」に訂正する。
6. 同第8頁第16行「シリンジ」を「第5図(a)に示すようにノズル」に訂正する。
7. 同第8頁第19行、第20行、第9頁第4行、第12頁第11行「シリンジ」を「ノズル」に訂正する。
8. 同第9頁第2行「第4」を「第5」に訂正する。
9. 同第9頁第3行「保持し、」を「保持したまま、」に訂正する。

代理人弁理士 杉 村 脱 秀  
外／名印